

(10)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-139496

(P2001-139496A)

(43)公開日 平成13年5月22日 (2001.5.22)

(51)Int.Cl'	摘要記号	F I	デコド' (参考)
A 61 K 49/00		A 61 K 49/00	4 B 0 2 4
A 01 K 67/027		A 01 K 67/027	4 B 0 6 5
A 61 K 39/00		A 61 K 39/00	H 4 C 0 8 4
A 61 P 37/00		A 61 P 37/00	4 C 0 8 5
C 12 N 5/10		C 12 N 5/10	4 C 0 8 7

審査請求 未請求 請求項の数19 O.L. (全 8 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平11-324771

(71)出願人 398020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番1号

(22)出願日 平成11年11月15日 (1999.11.15)

(72)発明者 高橋 洋介

徳島県鳴門市国南町井戸字北原敷45-1

(74)代理人 100107954

弁理士 廣田 雅紀

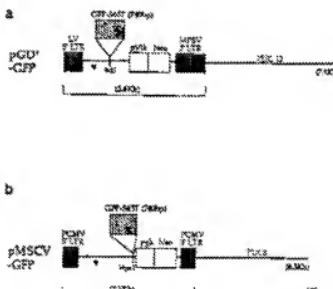
最終頁に統く

(54)【発明の名稱】 後天的免疫覚容の獲得方法

(57)【要約】

【課題】 外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその表現産物に対する後天的免疫覚容の獲得方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその表現産物に対する宿主細胞を回避することができる遺伝子治療効果の持続方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその表現産物に対する後天的免疫覚容を獲得した非ヒト動物を提供すること。

【解決手段】 外来遺伝子が組み込まれたウイルスベクター等の外来性DNAが導入された幼若マウス細胞を胸膜に導入して、胸膜腫瘍内で前記外来性DNAを表現させる。上記外来性DNAを幼若マウス球に導入する方法としては、例えば、幼若マウス球とウイルスベクター-遺伝ウイルスプロデューサー細胞とを共培養する方法を挙げることができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とする外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法。

【請求項2】 外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器管内で前記外來性DNAを発現させることを特徴とする請求項1記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法。

【請求項3】 外来性DNAが、少なくともアレルギー性疾患原起物質又は自己免疫性疾患起物質をコードする遺伝子を含むDNAであることを特徴とする請求項1又は2記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法。

【請求項4】 外来性DNAが、少なくともペプチド性免疫原をコードする遺伝子を含むDNAであることを特徴とする請求項1又は2記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法。

【請求項5】 外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法。

【請求項6】 ベクターが外來遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項5記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法。

【請求項7】 ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項5記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法。

【請求項8】 遺伝子治療における外來性DNAを幼若Tリンパ球を介して胸腺へ導入することを特徴とする遺伝子治療効果の特徴方法。

【請求項9】 遺伝子治療における外來性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器管内で外來性DNAを発現せることにより、外來性DNA及び／又はその発現産物により発現される免疫応答を亢進することを特徴とする請求項8記載の遺伝子治療効果の特徴方法。

【請求項10】 外來性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項8又は9のいずれか記載の遺伝子治療効果の特徴方法。

【請求項11】 ベクターが外來遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項10記載の遺伝子治療効果の特徴方法。

【請求項12】 ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項11記載の遺伝子治療効果の特徴方法。

【請求項13】 幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外來性DNAを導入することを特徴とする外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得した非ヒト動物。

【請求項14】 外來性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器管内で前記外來性DNAを発現せることを特徴とする請求項13記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得した非ヒト動物。

【請求項15】 外來性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項13又は14記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得した非ヒト動物。

【請求項16】 ベクターが外來遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項15記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得した非ヒト動物。

【請求項17】 ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項16記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得した非ヒト動物。

【請求項18】 非ヒト動物が腫瘍細胞に属する非ヒト動物であることを特徴とする請求項13～17のいずれか記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得した非ヒト動物。

【請求項19】 腫瘍細胞に属する非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項15記載の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得した非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、幼若Tリンパ球を介する胸腺へのDNA導入による、ウイルスベクター…由来成分等の外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法や、遺伝子治療における外來性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫対応を亢進することを特徴とする遺伝子治療効果の特徴方法や、ウイルスベクター…由来成分等の外來性DNA及び／又はその発現産物に対して後天的免疫対応を獲得したマウス等の非ヒト動物に想する。

【0002】

【従来の技術】 生体は一般に自己を構成する抗原に対しては免疫応答を示さない。これは自然ないし先天的免疫対応と呼ばれている。一方、本来異種の抗原であっても投与の時期（特に胎生期ないし新生期）、投与の方法（たとえば免疫抑制剤を用いるとか）、投与するときの性状（タンパク質抗原なら複数物を除いて投与する）によっては、その後の免疫応答に対して反応性を示さない状態を誘導できる。これは、後天的ないし獲得対応と呼

ばれている。また、免疫応答とは、一般に自己と自己以外のもの（非自己）とを識別し、非自己に対して免疫活性や免疫性的反応を起こしたものと捉えられている。この説明は、リンパ球表面にある抗原受容体によって行われ、非自己と認識した場合には、リンパ球が増殖して細胞傷害性を発揮したり抗体を產生するようになる。しかし、リンパ球による認識の最初の段階では、まず、樹状細胞やマクロファージが異物（非自己）を吸引し、Tリンパ球によって認識される形で提示するという段階が必要なので、自己と非自己の認識は樹状細胞やマクロファージとTリンパ球との相互作用のレベルで行われているとも考えられている。

【0003】一方、組換DNA等の実験により得られた外来遺伝子を患者の体細胞に導入して、その遺伝子の機能により該患者の遺伝子疾患を治療する遺伝子治療は、癌、免疫不全、心血管疾患等の多くの遺伝子疾患に適用されつつある。しかし、遺伝子治療を阻んでいる最も大きな原因は、遺伝子導入する際に用いるベクター（遺伝子導入のための運び屋）成分に対する上記免疫応答である。すなわち、細胞に遺伝子を導入することそのものは技術的に完成しつつあるが、遺伝子導入の為には必ず何らかのベクターを用いるのが必須ではない。また、このベクターの遺伝子導入方法としては、レトロウイルス・アデノウイルス・レンチウイルス等いろいろなウイルス系を用いるウイルスベクター法や、DNAを包み込んだ膜と融合させるリボソーム法や、直接遺伝子を導入するマイクロインジェクション法や、挿入DNAのサイズが制限されずかつ細胞親和性が高いといいセンダイウイルス（HVV）法（J. Biol. Chem. 264: 12126-12129, 1989; J. Biol. Chem. 266: 3361-3364, 1991; Biochim. Biophys. Res. Commun. 186: 129-134, 1993; Circ. Res. 73: 898-905, 1993; Science 243: 375-378, 1990; J. Clin. Invest. 94: 978-984, 1994）等が知られている。

【0004】上記のいずれの遺伝子導入方法においても、導入するベクターは我々の身体にとっては異物であるために、これらベクターの成分に対する免疫応答が悪化を引き起され、その結果、早晩のうちに（通常2週間から1ヶ月のうちに）生体はベクターを排除してしまう。例えばウイルスベクターの場合、ベクター成分が感染細胞内でタンパク質として発現し、そのタンパク質が細胞表面にペプチドとして発現され、Tリンパ球がベクター由来のペプチドを認識して感染細胞を殺し、ベクター（ウイルス）を排除してしまう。このように、現在の遺伝子治療においては、遺伝子導入のものには成功しても、長期の持続性効果を得ることには再現よく成功していない欠点があつた。

【0005】また従来、後天的免疫寛容の獲得方法に裏して、脂溶性成分又は脂溶性成分含有物質を抗原と同時にには説明さないことにより哺乳動物に対して免疫寛容

を誘導する方法（特開平9-194383号公報）や、黒豆投与によって実験的に葉理効果を示す、注射によって葉理効果を示す、かつ注射による繰り返し投与によって葉理効果が発揮されなくなる薬物を有効成分とする医薬製剤であって、黒豆免疫寛容を誘導するのに十分な投与単位数の該葉理効果を有する製剤と、黒豆免疫寛容が誘導された後に投与するための該葉理効果有する製剤とからなる葉理製剤を用いる方法（特開平10-298101号公報）や、移植受け入れ患者に付与した免疫的な免疫寛容を得た動物から脳髄を摘出することにより、移植された臓器のTリンパ球などで病变成れる実験性免疫過剰が、移植された後との組織適合抗原を攻撃せず、良好な臓器生長を有する人工臓器を用いて移植患者に免疫寛容を成立させる方法（特開平9-187470号公報）が知られている。

【0006】

【免疫が解消しようとする群衆】FTOC（幼若胸膜網膜癌株）においてレトロウイルスを介して遺伝子を実験導入する方法やTリンパ球におけるMAPキナーゼの役割に関する情報が報告（Cell 86: 243-251, 1996）されており、従来も胸膜に遺伝子を導入しようとする試みがあったが、正常の実験動物に比べても大発現率が悪く、既存のTリンパ球による抑制作用を抑える効果に乏しく、そのため実用化に至らなかった（FASER, J. 6: 285-3-286, 1992; Ann. Surg. 222: 229-262, 1995; J. Clin. Invest. 98: 2840-2847, 1996）。

【0007】本発明者らは、遺伝子治療を受けさせる個体のモデル動物として、マウスを用いて、グリーン蛍光蛋白質（GFP）遺伝子とレトロウイルスベクター（pGD）とを結合させたpGD-GFPを皮内や腹腔内に注入したところ、かかむマウスがベクター成分に対して免疫応答を示し、GFP遺伝子が組み込まれたウイルスベクターを2週間から1ヶ月のうちに体内から排出していたが、Tリンパ球を欠損した免疫不全マウスを用いて同様に実験を行ったところ、かかる免疫応答が起こらなかった。この原因はTリンパ球を介した細胞免疫応答、すなわちTリンパ球が遺伝子疾患の治療に有用なベクター遺伝子やその表現物を非自己として認識し排除しているものと考えられた。

【0008】本発明の群衆は、上記のように遺伝子治療用等の外因性遺伝子が組み込まれたベクター等の外因性DNAやその発現産物を「非自己」ではなく「自己」として認識せることができ、外因性遺伝子が組み込まれたベクター等の外因性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容の発現力が低く、外因性遺伝子が組み込まれたベクター等の外因性DNAやその発現産物に対する拒絶応答を阻害することができる遺伝子治療効果の持続方法や、外因性遺伝子が組み込まれたベクター等の外因性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、生体のTリンパ球が遺伝子導入用ウイルスベクターの成分を「自分」ではなく「自己」として認識するように、生体のTリンパ球系を再教育し、かかる導入遺伝子ベクターに対する免疫応答を回避させる方法を試験研究した結果、本発明者らの興味での幼若Tリンパ球への遺伝子導入テクニック (J. Immunol. 161: 2888-2894, 1998; Immunity 9: 565-574, 1998) を用いてマウス幼若Tリンパ球にpGD-GFP遺伝子を導入し、かかる遺伝子導入細胞をGFPの発現による蛍光染色を用いて精製し、正常のマウスのTリンパ球を一過性に拘束するため低濃度の放電線を照射し、遺伝子導入幼若Tリンパ球を胸膜に導入し、このマウスの放電線照射からの回復を待ってから、pGD-GFPレトロウイルスを皮内や腹腔内に注射したところ、幼若Tリンパ球抑制の効果で、マウス内で導入遺伝子GFPの発現は短時間にわたり持続していた。すなわち、肝ベクターも免疫応答を回避させることができ、持続的免疫応答が持続可能になることを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0010】またのところ、ベクター成分以外の外来分子に対する免疫応答は正常に保たれており、マウスの免疫系全体が傷害を受けたわけではなく、遺伝子性應用のベクターに対して特異的免疫応答が誘導されたことや、他の臓器で遺伝子導入用いるベクターをそのまま幼若Tリンパ球に導入させることは問題なく可能であることがわかった。この方法を用いることによって、自己・非自己の識別をもたらす中性標識である胸膜に、幼若Tリンパ球を介して焼却率よく遺伝子を導入することができ、胸膜気管内でのベクター成分の効率のよい発現と、それによる幼若Tリンパ球の自己覚認の成立がもたらされることがわかった。

【0011】すなわち本発明は、幼若Tリンパ球を介して胸膜へ外因性DNAを導入することを特徴とする外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法 (請求項1) や、外因性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸膜に導入して、胸膜腔内で前記外因性DNAを発現させることを特徴とする請求項1記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法 (請求項2) や、外因性DNAが、少なくともアレルギー性疾患起因物質又は自己免疫性疾患起因物質をコードする遺伝子を含むDNAであることを特徴とする請求項1又は2記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法 (請求項3) や、外因性DNAが、少なくともペプチド性治療薬をコードする遺伝子を含むDNAであることを特徴とする請求項1又は2記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法 (請求項4) や、外因性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項1～4のい

すれか型載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法 (請求項5) や、ベクターが外因性DNA導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項5記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法 (請求項6) や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項6記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応の獲得方法 (請求項7) に関する。

【0012】また本発明は、遺伝子治療における外因性DNAを幼若Tリンパ球を介して胸膜へ導入することを特徴とする遺伝子治療効果の持続方法 (請求項8) や、遺伝子治療における外因性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸膜に移入して、胸膜器官内で外因性DNAを発現させることにより、外因性DNA及び/又はその発現産物により誘導される免疫応答を回避することを特徴とする請求項8記載の遺伝子治療効果の持続方法 (請求項9) や、外因性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項8又は9のいずれか記載の遺伝子治療効果の持続方法 (請求項10) や、ベクターが外因性DNA導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項10記載の遺伝子治療効果の持続方法 (請求項11) や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項11記載の遺伝子治療効果の持続方法 (請求項12) に関する。

【0013】さらに本発明は、幼若Tリンパ球を介して胸膜へ外因性DNAを導入することを特徴とする外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得したヒト動物 (請求項13) や、外因性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸膜に移入して、胸膜腔内で前記外因性DNAを発現させることを特徴とする請求項13記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得したヒト動物 (請求項14) や、外因性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項13又は14記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得したヒト動物 (請求項15) や、ベクターが外因性DNA導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項15記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得したヒト動物 (請求項16) や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項16記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得したヒト動物 (請求項17) や、非ヒト動物が醫薬品に属する非ヒト動物であることを特徴とする請求項13～17のいずれか記載の外因性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫対応を獲得した非ヒト

動物(請求項1-8)や、靈長類に属する非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項1-8記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫覚対を獲得した非ヒト動物(請求項1-9)に関する。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の外來性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫覚対の獲得方法は、幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外來性DNAを導入することを特徴とし、詳しくは、外來性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に入れて、胸腺器官内で前記外來性DNAを発現させることを特徴とする。

【0015】本発明において外來性DNAとは、後天的免疫覚対を獲得しようとする動物に先天存在しないDNAをいい、その翻訳産物の翻訳物によって非自己として認識されるDNAをいう。また、本発明において外來遺伝子とは、後天的免疫覚対を獲得しようとする動物に先天存在しない遺伝子をいい、その翻訳産物が該動物にとって非自己として認識される遺伝子をいう。そして、前記外來性DNAとしては、外來遺伝子やペクター等目的遺伝子が組み込まれたペクター等を具体的に挙げることができ、外來遺伝子としては、例えば、少なくともアレンギー性疾患起因物質や自己免疫性疾患起因物質、特に深刻なアレンギー性疾患起因物質や後天的疾患リウマチの疾患起因物質であるMBP(ミエリン遮断性タンパク質)分子等の自己免疫性疾患起因物質をコードする遺伝子等や、少なくともペプチド性抗原ペプチド性疾患起因物質等をコードする遺伝子等を挙げることができ、また、ペクターとしては、前記外來遺伝子の導入用等のウイルスベクター、プラスミドベクター、ファージベクター、酵母人工染色体(YAC)ベクター等のベクターを例示することができるが、ウイルス粒子として感染させた場合に形質転換効率が非常に高い点でウイルスベクター、特にレトロウイルス、アデノウイルス、レンチクイルク等に由来するウイルスベクターを用いることが好ましい。これらウイルスベクターを用いる場合、該ウイルスベクターを予め宿主細胞に感染させ、ウイルスプロデューサー細胞として用いることが好ましい。

【0016】本発明において用いられる幼若Tリンパ球とは、抗原受容体及び細胞的コレセプターCD4/CD8などを発現する成熟Tリンパ球になる前のTリンパ球をいい、例えば、成糞細胞Tリンパ球から分離、精製することにより、また胎生1.4~1.8日頃の胸腺細胞から得ることができる。胎生1.4~1.5日頃の胸腺細胞は、左右両葉が顕著に心臓上方に存在し、透明感のある球体で周辺組織とは区別しやすく成熟Tリンパ球の混入がない点で、この時期の胸腺細胞を用いることが好ましい。

【0017】本発明における外來性DNAを幼若Tリンパ球へ導入する方法としては、本発明者が開発した遺伝子導入テクニック(『J. Immunol. 161, 2889-2894, 1998, Immunity 9, 565-574, 1998』)、例えば、幼若Tリ

ンパ球とウイルスプロデューサー細胞を共培養し、ウイルスプロデューサー細胞よりも大きさが小さく、増殖度が低いことをを利用して、遺伝子が導入された幼若Tリンパ球をフォワード&サイドスキャッター(Forward and side scatter)により分離し、並行活性化セルソーターにより、生存能力のある幼若Tリンパ球を分離・精製する方法や、造血細胞マーカーCD45に対する抗体を染色したものを使用して、フローサイトメトリーセルソーターでGFP/CD45⁺細胞をソートすることにより遺伝子が導入された幼若Tリンパ球を、維持芽胞由来のウイルスプロデューサー細胞から識別して分離・精製する方法を用いることが、Tリンパ球の教育器官である胸腺器官内で、外來性DNA導入細胞を分化・成熟させることができるとする点で好ましい。

【0018】本発明の外來性DNAの発現産物に対する後天的免疫覚対は、例えば、上記方法により得られた幼若Tリンパ球に前記外來遺伝子等の目的遺伝子が組み込まれたペクターを導入し、かかるペクターが導入された幼若Tリンパ球を、胸腺への直接注射や、脛静脉注射することにより胸腺に移入させ、胸腺器官内でかかる外來性DNAを発現させることにより獲得することができる。その際、外來性DNAにより惹起される免疫応答も同時に回避することができる。

【0019】本発明における遺伝子治療効果の持続方法は、遺伝子治療における外來性DNAを幼若Tリンパ球を介して胸腺へ導入することを特徴とし、特に遺伝子治療における外來性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺へ導入して、胸腺器官内で外來性DNAが発現することにより、外來性DNA及び/又はその発現産物により惹起される免疫応答を例えば1ヶ月以上の長期間にわたり回避することを特徴とするものであり、遺伝子治療効果の持続は、前記外來性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫覚対の獲得方法における外來性DNAとして、遺伝子治療に有用な外來性DNAを用いる場合に達成することができる。

【0020】本発明における外來性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫覚対を獲得した非ヒト動物は、幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外來性DNAを導入することを特徴とし、特に外來性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外來性DNAを発現させることを特徴とする。かかる非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ等の哺乳動物を例示することができるが、育成、使用の簡便さ等からしてマウスが好ましい。以下、本発明を、非ヒト動物がマウスの場合に例にとっての実施例を挙げて更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に規定されるものではない。

【0021】

【実施例】実施例1(免疫波の調製)

50 RPMI 1640 [最終濃度で、5.0 μMの2-メルカ

9
 プロテオノール(シグママカル社製)、1.0 mMのヘンレス(Gibco BRL社製)、2 mMのL-グルタミン(Gibco BRL社製)、1×非必須アミノ酸(Gibco BRL社製)、1 mMのビルビン被塗ナトリウム(Gibco BRL社製)、100 U/mのペニシリン(Gibco BRL社製)、100 µg/mのストレプトマジン(Gibco BRL社製)を含む培地]に、56 °Cで30分間熱処理をした10%のクシ酸血清(FCS)を添加した培養液(10% FCS-RPMI1640培地)を調製した。なお、実施例における操作はすべてクリーンフード内で無菌的に行つた。

【0022】実施例2(マウス胎仔臍臍膜の採取)

妊娠日数15～16日目のマウスを頸部切断により殺し、70%のエタノールでマウスの腹部を清拭した後、胎仔を子宮ごと100 mm無菌皿に取り出した。この子宮から胎仔を取り出して、実施例1の培地2.0～3.0 mlの入った1.0 mm無菌皿に胎仔を移し、2～3回静かに皿を回転させ洗浄して血痕とその余の実験液を取り除いた。かのうマウス胎仔を頭側臍下に置き、静かに腹部を切開して2つの胸臍葉を取り出し、ガーゼの上に置き血液を取り除き、マウス胎仔臍臍膜を採取した。

【0023】実施例3(培養ウェルの調製)

殺出したヘリシット(HelloSite)スponジ(Dallas-Tec, Inc., Plainsboro, NJ 08836)の小片を2.4ウェルプレート(底径1.6 mm、無蓋)の培養ウェルに置き、実施例1の培地1 mlを入れ、スponジのなめらかな面を上に向か、無菌ボリカーボネートフィルター管(Costar, Nuclepore Corp. PC membrane, #10400, 直径1.3 mm)をその上に置き、フィルター管を鏡子で裏返して、フィルター管の両面を培地で完全に浸した後、そこから0.5 mlの培地をウェルから静かに吸引取り、最終の培地を1ウェル当たり0.5 mlに調製した。

【0024】実施例4(マウス臍臍膜の組織培養)

実施例2で得られた4～6葉の臍臍膜を、実施例3で調製した培養ウェルのスponジ上のフィルター管に被置し、臍臍膜が培養液に接觸しない状態で、CO₂インキュベーター中にて培養した。

【0025】実施例5(胎仔臍臍膜培養後の単細胞浮遊液の調製)

2.0 mm皿の表面の中心に、100 µlの染色緩衝液(D, 2%のウシ血清アルブミン(BSA)と0.1%のNa₂EDTAを含む)H-7、2のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を滴下し、その中に実施例4で組織培養した臍臍膜を移し、7型錐子を用いて臍臍膜の数をカウントした。次にホルマリノンメッシュ(およそ5 mm²)を培養液が移された緩衝液の上に載せ、針先の曲がった2.6ゲージ針(先端から5 mm, 90度の角度)と1 mlシリジンを用いて、これらをホルマリノンメッシュに押しつけながら臍臍膜をそつと剥き、得られた単細胞浮遊液をシリジン内のプラスチックチューブに移し、総

胞の数をカウントして所定濃度の細胞懸濁液を調製した。

【0026】実施例6(ウイルスプロデューサー細胞の作製)

GFP遺伝子から調製したS 6.5 T変異体をコードする7.40 bpのDNA(クローンテック社製)をpCD'のBcl1 Iサイト(図1a)又はpMSCVのHpa1 Iサイト(図1b)にクローニングした。このクローニングにより得られた組み換えベクターをG P+E-E-8.6細胞にトランسفエクションした。G 4.18耐性細胞の中から、FACSバシテージセルソーター(Becton Dickinson社製)を用いてGFP⁺クローニングを分離した。分離されたクローニングから得られた過疎上清の希釈液とNIH-3T3(ATCC CRL-1658)のG 4.18耐性細胞をいっしょに1日間培養し、ウイルスの力値を測定し、10³ CFU/m以上の力値を有するウイルスプロデューサー細胞(組み換えベクターをインフェクションしたG P+E-E-8.6細胞)を以下の実施例に用いた。

【0027】実施例7(ウイルス感染幼若Tリンパ球の作製)

上記実施例6によって得られた単細胞の幼若Tリンパ球濃度を最終的に0.5～2×10⁶個/ウェルとなるよう9.6フラットウェルに分注し、さらにあらかじめトリプシン処理し、1日間培養した上記ウイルスプロデューサー細胞を1ウェル当たりに2～5×10³個加え、これをウェル内で混合した。この混合物を、最終濃度1～5 ng/mlのマウスの組換えIL-7(インターロイキン7; Genzyme社製)、又はこれと最

終濃度1～5 ng/mlの幹細胞因子(SCF)の存在下において1～2日間培養した。その後、共培養した幼若Tリンパ球を静かにビバッティングしながら回収した。幼若Tリンパ球はプロデューサー細胞よりも小さく、密度が低いことをを利用して、遠心子が導入された幼若Tリンパ球(図2のa部分)をフォーワード&サイドスキャッター(forward and side scatter)により分離し(図2)、蛍光活性化セルソーターにより、生存能力のある幼若Tリンパ球を分離・精製した。また、造血細胞マーカーCD45に対する抗体を染色したものを使用して、フローサイトメトリーセルソーターでGFP⁺CD45⁺細胞をソートすることにより、遠心子が導入された幼若Tリンパ球を、純粋幹細胞由来のウイルスプロデューサー細胞から識別して分離・精製した。

【0028】実施例8(遺伝子導入幼若Tリンパ球による導入遺伝子の発現)

正常なマウス(8日)のTリンパ球を一過性に拘制するために低濃度の放射線を照射し、上記実施例7により得られた遺伝子導入幼若Tリンパ球を胸膜へ直接注入することにより胸膜に移入した。このマウスの放射線照射からの回復を待ってから、pCD-GFPレントコイル

(7)

特開2001-139496

11

を導入した脾細胞を腹腔内に投射し、2週間後、抗GFP抗体を酵素抗体法を用いて血中抗体価で測定した。また、コントロールとして抗E. SA (牛血清アルブミン) 抗体を同様に測定した。結果を図3に示す。図3中、“No treatment”は無処理の正常なマウス (B6) における血中抗体価を意味し、当然のことながら抗体が生成しないことがわかる。“pGD-GFP ip”は、正常なマウス (B6) にpGD-GFPアレントコウイルス導入脾細胞を腹腔内に投射したときの血中抗体価を意味し、GFPの発現により抗GFP抗体が生成していることが示されている。“pGD-GFP It”は、pGD-GFPアレントコウイルス導入脾細胞を腹腔内に投射しない上記実験例7により得られた遺伝子導入幼若Tリンパ球胸臍移入マウス (B6) の血中抗体価を意味し、このマウスでは抗GFP抗体が殆ど生成しないことがわかる。“pGD-GFP It-pGD-GFP ip”は、上記実験例7により得られた遺伝子導入幼若Tリンパ球胸臍移入マウス (B6) に、pGD-GFPアレントコウイルス導入脾細胞を腹腔内に投射したときの血中抗体価を意味し、このマウスにおいて抗GFP抗体が殆ど出現していないことがわかる。以上の結果から、上記実験例7により得られた遺伝子導入幼若Tリンパ球胸臍移入マウス (B6)において、ウイルスベクター由来のGFP成分に免疫応答が成立したことを見認めた。すなわち、抗ベクター免疫応答を回避させることができ、持続的な遺伝子治療が可能となることがわかった。

12

*わかった。またこのとき、ベクター成分以外の外來分子に対する免疫応答は正常に保たれており、マウスの免疫系全体が傷害を受けたわけではなく、遺伝子治療用のベクターに対して特異的免疫応答が誘導されたことを確認した。

【0029】

【発明の効果】本発明によると、外來遺伝子が組み込まれたベクター等の外來性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腔に導入して、脾臓器室内で上記外來性DNAを発現させることにより当該外來性DNAやその発現産物に対して後天的免疫応答を誘導させることができ、また、かかる外來性DNAやその発現産物に対する拒絶応答を回避させ、遺伝子治療の効果を長期間安定して持続して得ることもできる。さらに、本発明の外來遺伝子が組み込まれたベクター等の外來性DNAやその発現産物に対する後天的免疫応答を獲得した非ヒト動物は、遺伝子治療等の研究開発に用いると極めて有用である。

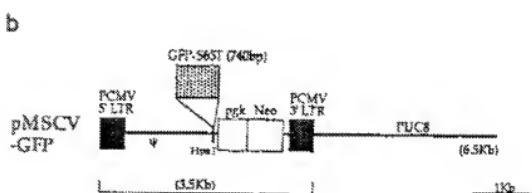
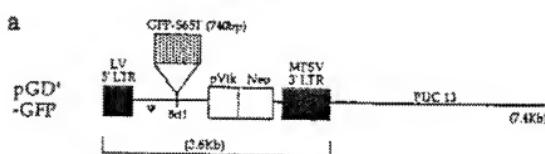
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明における遺伝子導入用いたベクターの構成を示す図である。

【図2】フォーワード&サイドスキャッターによる遺伝子導入幼若Tリンパ球とウイルスプロデューサー細胞の分析結果を示す図である。

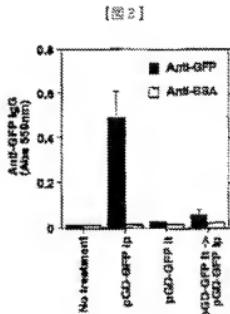
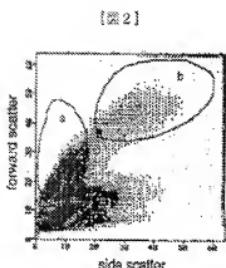
【図3】遺伝子導入幼若Tリンパ球胸臍移入マウスにおける免疫応答の結果を示す図である。

【図1】



(8)

特開2001-139496



フロントページの続き

(51) Inv. Cl.	摘要記号	F I	チ-テ-」(参考)
C 12 N	7/00	A 61 K 35/14	Z
	16/09	35/24	
// A 61 K	35/14	35/76	
	35/24	C 12 N 5/00	B
	35/76	15/00	A

アターム(参考) 4B024 AA01 BA06 CA02 DA02 EA02
 GA11 GA18 HA17
 4B065 AA90X AA92X AA95Y AA97Y
 AP01 AC04 BA02 RS05 CA24
 CA44
 4C084 AA13 NA14 ZB022 ZC552
 4C085 AA02
 4C087 AA01 AA02 BB37 BB42 BB65
 BC83 CA12 NA14 ZB02 ZC55